

ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО СЕНСОРА НА ОНКОМАРКЕРЫ НА ОСНОВЕ АПТАМЕРОВ

А.В. Шабалина, Д.М. Ежов

Научный руководитель: доцент, к.ф.-м.н. В.А. Светличный

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: shabalinaav@gmail.com

APTAMER-BASED ELECTROCHEMICAL SENSORS FOR TUMOR MARKERS CHARACTERIZATION

A.V. Shabalina, D.M. Ezhov

Scientific Supervisor: Associate Prof., Dr. V.A. Svetlishnyi

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: shabalinaav@gmail.com

Abstract. *In the present study, aptamer layer on the surface of golden electrode was characterized by electrochemical and microscopic methods. Island-like structure of the layer was shown. It was proved that after aptamer immobilization on the solid surface, it is still able to specifically bind tumor marker for lung cancer.*

Введение. Аптамеры – олигонуклеотиды или пептиды, обладающие способностью к специфическому связыванию с целевым молекулам-мишенями. Сенсоры на основе аптамеров (аптасенсоры) обладают высокой селективностью и чувствительностью определения выбранной мишени. Электрохимический аптасенсор представляет из себя индикаторный электрод, покрытый слоем аптамера, специфичного к определенной мишени [1]. Интенсивность и направление протекания электрохимических процессов в значительной мере определяется состоянием поверхностного слоя аптамеров. Важным является толщина покрытия, его сплошность (непрерывность двухмерной структуры), его стабильность во времени и устойчивость к воздействиям. Несмотря на обилие работ в области создания аптасенсоров, малое число авторов уделяет достаточное внимание характеристикам модифицирующего аптамерного слоя на индикаторном электроде. Самым распространенным является определение величины покрытия поверхности электрода аптамерами по результатам электрохимических измерений (например, в работе [2] величина покрытия составляла от 80 до 95%). Остальные авторы, в основном, предполагают присутствие непрерывного монослоя аптамеров на поверхности, не подтверждая этого экспериментально (например, как в работе [3]). Привлечение микроскопических методов для определения структуры покрытия аптамерного слоя на электродной поверхности затруднено по причине высокой чувствительности 3D структуры ДНК-аптамеров к среде. Вакуумирование при электронной микроскопии может привести к изменению конформации молекул ДНК, с потерей информации об истинном расположении аптамеров. Метод конфокальной лазерной сканирующей микроскопии может быть успешно применен для микроскопического анализа объектов биологической или органической природы в условиях близких к условиям электрохимического анализа, т.е. в водной среде, хотя данный метод имеет меньшее по сравнению с электронной микроскопией пространственное

разрешение. В данной работе была поставлена цель охарактеризовать покрытие золотого электрода ДНК-аптамером, специфичным к онкомаркеру рака легкого, с использованием электрохимических и микроскопических методов. При этом использовалась стандартная (описанная в литературе) методика иммобилизации аптамера с тиоловым праймером на предварительно подготовленную золотую поверхность.

Материалы и методы. ДНК-аптамер LC-29, специфичный к опухолевому маркеру рака легкого, был предоставлен Красноярским государственным медицинским университетом [4]. Золотые планарные электроды в составе мультиплексных чипов произведены АО «Электроконнект», г. Новосибирск. Иммобилизация аптамера на предварительно подготовленную поверхность производилась в течение 12 часов в соответствии со стандартной методикой [4]. Измерения проводились на электрохимической станции CH-600, CH Instruments, с хлоридсеребряным (1 М KCl) и платиновым электродами в 2,5 мМ раствор $K_4[Fe(CN)_6]$ и $K_3[Fe(CN)_6]$ в 20 мМ Трис-ClO₄ буферном растворе (pH=8,6). Проводились измерения при квадратно-волной развертке потенциала (SWV) в диапазоне от -0,2 до +1,0 В с частотой 10 Гц. Микрофотографии поверхности аптасенсора были получены на сканирующем электронном микроскопе Vega 3H, Tescan (метод SEM), и на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM 780 NLO, Carl Zeiss (метод CLSM).

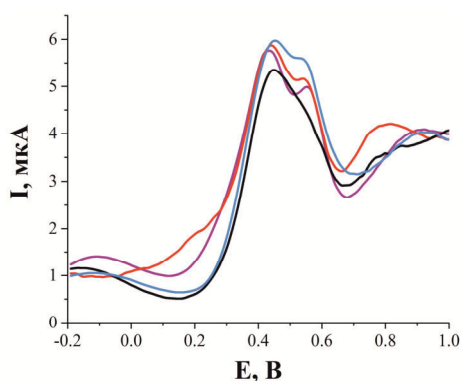


Рис. 1. Данные SWV в растворе гексацианоферратов калия для чистого золотого электрода (черная линия) и модифицированного ДНК-аптамерами (цветные линии, 3 параллельных эксперимента)

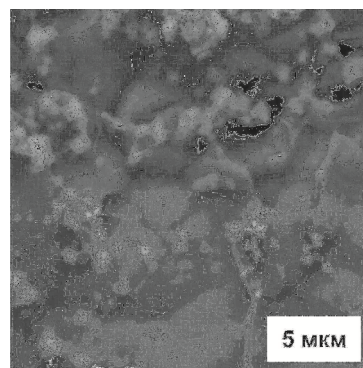


Рис. 2. SEM-изображение поверхности модифицированного ДНК-аптамерами золотого электрода

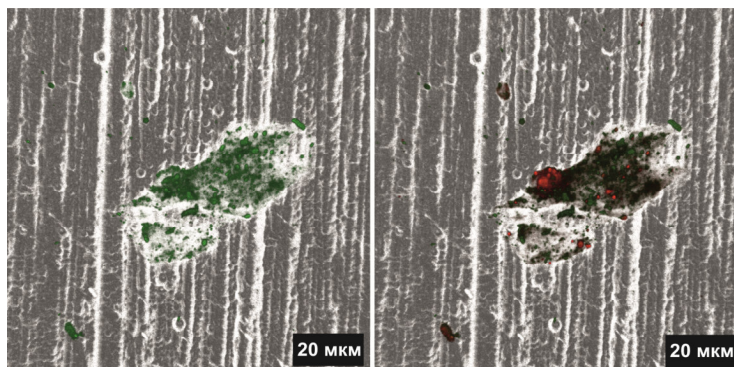


Рис. 3. CLSM-изображение поверхности модифицированного ДНК-аптамерами золотого электрода, полученное методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. ДНК-аптамер визуализирован в зеленом цвете, белок онкомаркер – в красном

Результаты и обсуждение. По литературным данным, слой аптамера препятствует доступу редокс-медиатора к поверхности электрода, снижая тем самым величину тока на вольтамперограммах. На этом основан принцип действия большинства электрохимических аптасенсоров. На рисунке 1 приведены вольтамперограммы, полученные методом SWV для чистого золотого электрода и трех золотых электродов, модифицированных ДНК-аптамером (параллельные эксперименты). Можно заметить, что в присутствии аптамера на поверхности, пик тока, напротив, увеличивается и расщепляется на 2 вершины. По СЭМ-изображению на рисунке 2 можно отметить, что молекулы аптамера приняли форму глобул (очевидно во время высушивания и вакуумирования). Поэтому оценить равномерность покрытия электрода аптамерами по данным СЭМ затруднительно. Для решения данной задачи был привлечен метод CLSM (рисунок 3). Было обнаружено, что, даже оставаясь под слоем жидкости (буферный раствор), аптамер располагается на электроде не сплошным слоем, а «островками». Таким образом, предположения о непрерывности модифицирующего слоя аптамера не подтвердились. Методом CLSM была изучена поверхность электрода с аптамерами после инкубирования аптасенсора под плазмой крови больного раком легкого. На правой части рисунка 3 видно, что целевой белок-онкомаркер (показан красным цветом) располагается только в областях расположения аптамера (показан зеленым цветом) и не закрепляется на пустом электроде. Следовательно, способность к специфическому связыванию целевых молекул не была утрачена аптамером после его пришивки к золотой поверхности.

Закключение. Показано, что модифицирующий слой ДНК-аптамера на поверхности золотого индикаторного электрода представлен отдельными островками, а не непрерывным монослоем. Это сказывается на воспроизводимости результатов электрохимических измерений. Доказано, что после иммобилизации на твердую поверхность аптамер сохраняет способность специфически связывать белок-онкомаркер рака легкого, что является важным показателем для успешного создания аптасенсора. Требуется дальнейшая работа над повышением величины покрытия электрода молекулами аптамера и оптимизация процедуры модифицирования.

Работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-5248.2018.3 (Договор №14.Y30.18.5248-МК от 17.01.2018).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Velasco-Garcia M.N., Missailidis S. New trends in aptamer-based electrochemical biosensors // *Gene Therapy and Molecular Biology*. – 2009. – V.13. – P. 1–10.
2. Kara P., Erzurumlu Y., Ballar Kirmizibayrak P., Ozsoz M. Electrochemical aptasensor design for label free cytosensing of human non-small cell lung cancer // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2016. – V. 775. – P. 337–341.
3. He B. Differential pulse voltammetric assay for the carcinoembryonic antigen using a glassy carbon electrode modified with layered molybdenum selenide, graphene, and gold nanoparticles // *Microchim Acta*. – 2017. – V. 184. – No. 1. – P. 229–235.
4. Zamay G.S., Zamay T.N., Kolovskii V.A., et.al. Electrochemical aptasensor for lung cancer-related protein detection in crude blood plasma samples // *Scientific Reports*. – 2016. – V. 6. – Article number: 34350 (8 pages).